



- ¹ Ertuğrul Kaya
² Ilgaz Akata
³ Sinan Bakırcı
⁴ Deniz Dereli
⁴ Eda Küçükğüven
⁵ İsmail Yılmaz

İMMÜNOKROMATOĞRAFİK KART TESTLERİN ÇALIŞMA PRENSİBİ VE ÜRETİM TEKNİKLERİ

Working Principle and Production Techniques of the Immunochromatographic Card Tests

- ¹ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Düzce
² Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara
³ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Düzce
⁴ İstanbul Atatürk Fen Lisesi, İstanbul
⁴ İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Farmakoloji Birimi, İzmir

ÖZET

İmmünokromatografik kart testler düşük maliyetli, uzun raf ömürlü, yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip, düşük dedeksiyon limiti taşıyan, hızlı sonuç verebilen ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılan testlerdir. Sıklıkla gebelik testi amaçlı kullanılmakla birlikte gıda güvenliği, uyuşturucu tarama testleri, mikrobiyolojik tanı testleri gibi oldukça geniş alanlarda da kullanımı söz konusudur. Testte kullanılan nanopartiküller sayesinde analiz sonucu gözle görülebildiğinden çoğu zaman ek bir cihaza gerek duyulmamaktadır. Bu testler sıklıkla kalitatif bir yöntem olarak kullanılır. Ancak aynı teste farklı dedeksiyon limitlerine sahip birden fazla test bölgesi eklenerek yarı kantitatif testler olarak da kullanılmaktadırlar. Bu testlerde esas olarak yüksek seçiciliğe sahip antijen-antikör reaksiyonu kullanıldığından, doğruluk oranları genel olarak %98'in üzerinde olmaktadır. Sandviç ve yarışmalı model olmak üzere 2 farklı tipi bulunur.

Bu derlemeyle, “gebelik testi nasıl çalışır?” veya “yeni bir kart test nasıl üretilir?” gibi sorulara cevap bulunmasının yanı sıra, yeni bir immünokromatografik kart test üretmek isteyenler için yol gösterici olmak amaçlanmıştır. Çalışmanın kendi konusunda Türkçe olarak yazılmış ilk derleme olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: İmmünokromatografik kart test, analiz testi geliştirme, test çalışma prensibi.

ABSTRACT

The lateral flow immunoassays have low cost, long shelf life, high precision and selectivity, a low detection limit. These tests can give quick results and are used all over the world. Lateral flow immunoassays can be used in wide area such as pregnancy test, drug screening tests, microbiological diagnostic tests and food safety tests. A person can see the results of these tests clearly with eyes so there is no need for any other analysis machine in order to see the results. These tests are usually used as a qualitative method but if we add most test lines that have different detection limits at the same test, we can obtain half quantitative tests. Antigen-antibody reactions that have a specificity are used mainly at these tests so their accuracy rates are over %98. There are two types as sandwich model and competitive model.

A person that read this article can answer questions that “how a pregnancy test works?” or “how can we make a new lateral flow immunoassay?”. In addition we hope that this article can help people who try to do new lateral flow immunoassays. For our researches, this article is the first article about card tests in Turkish.

Key words: Lateral flow immunoassay, development of analytic test, working principle of test.

Submitted/Başvuru tarihi:
24.06.2014
Accepted/Kabul tarihi:
09.07.2014
Registration/Kayıt no:
15.06.403

Corresponding Address / Yazışma Adresi:

Dr. Ertuğrul Kaya

Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı,
Düzce

drekaya@yahoo.com

Tel: 0505 4062632

© 2012 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

GİRİŞ

Zaman ilerledikçe teknoloji gelişmekte, artan insan nüfusuna paralel olarak toplumun ihtiyaçları da artmaktadır. Özellikle teknolojinin gelişmesiyle hayatımıza daha çok kimyasal madde girmektedir. Çevresel toksinler, gıdalar, gıda katkıları, kozmetikler, ilaçlar, pestisitler, sanayi atıkları gün geçtikçe insan hayatını daha fazla etkilemektedir. Ayrıca zamanla hastalıklar daha iyi tanınmakta, tedavi olanakları da artmaktadır. Tüm bu gelişmeler sonucu insanlığın daha fazla analiz ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Buna paralel olarak da hızlı sonuç veren ve kolay kullanılan bazı analiz yöntemlerinin kullanım alanı yaygınlaşmaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan analiz araçları arasında immünokromatografik testler bulunmaktadır. Bu testler içinde gözle görülerek sonucu yorumlanan immünokromatografik kart testler en popüler olanlardır. Ekonomisi çok güçlü olmayan toplumlarda ucuz olmaları, kolay kullanılabilirliği ve laboratuvar ekipmanları gerektirmemeleri nedeniyle bu testlere daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır (1).

İmmünokromatografik kart testlerin isimlendirilmesi konusunda maalesef ortak bir konsensüs bulunmamaktadır. Bu derlemede kullanılan "immünokromatografik kart test" ve aynı amaçla kullanılan "kart test" isimleri de buna dahildir ve dilimizde ortak bir terminoloji bulunmamaktadır. Günlük hayatta kart test, immünokromatografik kart test, immünokromatografik test, kromatografik kart test, dip test, dipstik test, dipkart test, strip test, yanak akış testi gibi farklı adlar kullanılmaktadır. İngilizce olarak ise; "lateral flow assay, lateral flow immunoassay, lateral flow biosensor, lateral flow sensor, lateral flow immunochromatographic test, point-of-care test, dipstick test, rapid test, immunoassay rapid test, rapid diagnostic test" gibi bazı adlarla bilinmektedir (1-5). Mevcut teknolojide yapılan ufak değişiklikler sonrası ortaya çıkan yeni ürünler de isimlendirmeyi artırmaktadır (immün floresan testler gibi) (6).

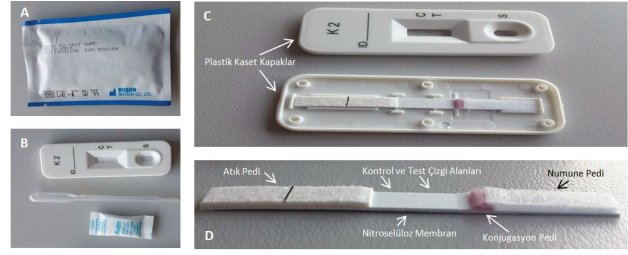
İlk kağıt tabanlı analitik prosedür kromatografi kağıdıdır. Bunu icat eden Martin ve Syngge isimli bilim adamları, 1952 yılı Nobel kimya ödülüne layık görülmüşlerdir (7). 1953 yılında Clark ve ark. tarafından ilk tanımlanması sonrasında günümüze kadar birçok biyosensör yaşantımızda yerini almıştır (8). Halk arasında gebelik testi amacıyla kullanımının oldukça yaygınlaşması neticesinde ise immünokromatografik kart testler tüm dünyada oldukça popüler hale gelmiştir. Günümüzde gebelik testi dışında, uyuşturucu tarama testleri, gıda güvenlik testleri, mikrobiyolojik tanı testleri, toksin testleri, organ yetmezliği testleri, veterinerlikte hastalık teşhisi gibi birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılırlar (9-16).

Bu testler sağlık alanında da oldukça sık olarak kullanılmaktadır. Gelişmiş ülkelere kabul edilen bu test yönteminin daha kullanışlı ve güvenilir olabilmesi için Dünya Sağlık Örgütü'nün bazı kriterleri vardır: "Affordable, sensitive, specific, user-friendly, robust and rapid, equipment-free, deliverable to those who need the test" kriterlerinin baş harflerinden oluşan "ASSURED" yani "kendinden emin" kelimesi ile bu testlerin karşılaması gereken kriterler ifade edilmiştir. Bu kriterler özetle; "ulaşılabilir, duyarlı, özgül, kullanımı kolay, kesin ve hızlı sonuç veren, cihaz gerektirmeyen, toplumda ihtiyaç duyulan" özelliklere sahip olmak şeklinde ifade edilebilir (7).

İmmünokromatografik kart testlerin, bilinen kaset şekilleri dışında kullanım amacına bağlı olarak geliştirilmiş farklı tasarımları da bulunmaktadır. Dipstik ve bardak testleri buna örneklerdir. Bu testlerin tıbbi tanı ve özellikle uyuşturucu tarama testi amaçlı olarak kullanımı oldukça yaygındır. Testler kişilerin idarında yapıldığından, testin idrar içine daldırılması ile yapılan "dipstik" testler, "daldırma testi" ismiyle de bilinmektedir. Birden fazla şeridin yan yana eklenmesiyle, birçok maddeyi aynı anda analiz eden panel şekilleri de bulunmaktadır. Ayrıca kart test şeritlerinin bardak kapağına entegre edilmesi ile elde edilen "bardak test" şeklinde uygulamaları da bulunmaktadır (17-18).

AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI

İmmünokromatografik kart test kullanımının az sayıda dezavantajına karşın, birçok avantajı bulunmaktadır. Başlıca avantajları yüksek duyarlılığa ve seçiciliğe sahip olmaları, üretiminin kolay olması, düşük maliyetli olmaları, testlerin tek olarak uygulanabilmesi, cihaza gerek duyulmaması, sahada gerçekleştirilebilmesi, raf ömrünün uzun olması, analiz metodunun kolay uygulanması ve özel eğitim gerektirmemesi, sonucun gözle görülebilir olması, uzman kişilere gerek duyulmaksızın herkes tarafından uygulanabilecek kadar kolay olması, sonuçların güvenilirliğinin yüksek olması, moleküller dışında tam hücre ve nükleik asit yapılarının analizi için de kullanılabilmesidir (1, 19). Dezavantajları ise tam kantitatif uygulamasının olmayışı, kullanıcılar arasında sonuçların yorumlanmasında farklılıklar olabilmesi, çok küçük volümlerin analizde yetersiz kalması, şerit başına tek bir analitin ölçülebilmesi ve sadece sıvı numuneler için kullanılabilmesidir (1, 19).



Şekil 1: İmmünokromatografik kart testlerin genel görünümü: A; paketli görünüm, B; paket içeriği, C; plastik kapak açılmış görünüm, D; iç şeridin görünümü ve bölümleri.

İMMÜNOKROMATOĞRAFİK KART TESTLERİN YAPISI

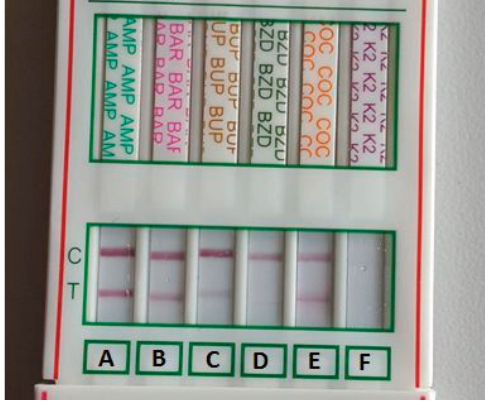
İmmünokromatografik kart testler genelde şerit yapısında üretilirler. Sıklıkla eni 4-6 mm, boyu 6-7 cm, kalınlığı ise 1-2 mm'dir. Kapiller akım prensibine göre çalıştığından bu boyutlar genelde benzerdir. İmmünokromatografik kart testlerin yapısında dikkat çeken bölümler genel olarak aşağıda yer almaktadır (1, 20, 21) (Şekil 1):

- 1-Plastik taban ve kaset kapak
- 2-Numunenin damlatıldığı ve selüloz yapılı "numune pedi"
- 3-Renkli molekül ve antikorların bulunduğu, reaksiyonların gerçekleştiği fiber glass yapılı "reaksiyon pedi"
- 4-Kapiller akımın gerçekleştiği ve sonucun izlendiği nitroselüloz membran
- 5-Test çizgisi ve kontrol çizgisi
- 6-Artan numunenin biriktiği selüloz yapılı "atık pedi".

İmmünokromatografik kart testlerin üstü plastik kaset kapak ile kapalıdır ve sadece numune damlatma alanı ile gözlem penceresi alanı açıktır. Bu nedenle sadece bu alanlar gözle görülebilir. Numune damlatma alanının hemen altında numune pedi bulunmaktadır ve damlatılan numune öncelikle bu pedde birikir. Numune, bu pedin sıvı tutma kapasitesinden fazla damlatıldığından sıvı bu pede temas eden konjugasyon pedine doğru ilerler. Konjugasyon pedinin üzeri kapalıdır ve renkli moleküller bu pedde bulunur. Konjugasyon pedine gelen sıvı numune buradaki moleküllerle reaksiyona uğrar, bu peddeki molekülleri de sürükleyerek buna temas eden nitroselüloz membrana doğru ilerler. Nitroselüloz membranın ilk kısmı örtülüdür, ancak daha sonraki test ve kontrol çizgisini içeren bölümünün üzeri açıktır; test sonucu buradan gözlemlenir. Nitroselüloz membrana gelen sıvı, içindeki molekülleri de sürükleyerek membran üzerinde kapiller akım kuvvetine göre membranın sonuna doğru ilerler. Bu sırada test çizgisi ve kontrol çizgisinde ilgili reaksiyonlar gerçekleşir ve buna göre test sonucunu belirten renkli çizgiler oluşur. Sıvı daha da ilerleyerek membranın sonuna temas eden atık pedinde birikir, bu alanın da üzeri kapalıdır. Tüm bu olaylar yaklaşık olarak birkaç dakika içinde gerçekleşir ve sonuç en fazla 5 dakika içinde okunabilir. Test sonucunu belirten çizgiler saatler boyunca değişmeden kalır. Pedler ve nitroselüloz membranın bütünlüğünü korumak için en alta bir plastik taban yerleştirilir ve tüm diğer parçalar bu plastiğin üzerine sabitlenmiş haldedir. Numune olarak direkt kanın kullanıldığı modellerde bu yapılara ilave olarak kan filtresi gibi bazı farklı elemanlar da bulunabilir (22, 23).

İMMÜNOKROMATOĞRAFİK KART TESTLERİN KULLANIMI

Testler genellikle tek olarak paketlenmiş haldedir ve uzun süre bozulmaması için paket içinde ayrıca bir nem alıcı madde bulunur (genellikle silika jel). Numunenin kullanım şekline bağlı olarak çoğunlukla paket içinde veya ayrıca bir damlalık bulunabilir. Bu testlerde numunenin sıvı olması gerekmektedir. Eğer numune sıvı halde değilse veya yeterince akışkan değilse, bu durumda paket

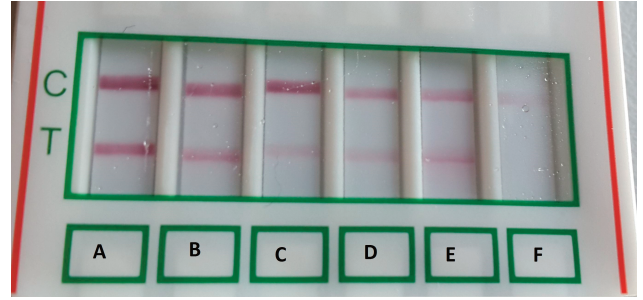


Şekil 2: Yarışmalı modelde üretilmiş panel tipi çoklu immünokromatografik kart testin sonuçlarının yorumlanması. A, B, C ve E şeritlerinde sonuç negatif; D şeridinde sonuç pozitif; F şeridinde hiç çizgi yoktur, bu şeritte sonuç geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.

çinde veya dışında numuneyi sıvılaştırarak veya seyreltecek ilave solüsyon ve ekipman da bulunur. Kullanım sırasında öncelikle paket yırtılarak açılır, numune sıvı değilse uygun şekilde sıvı hale getirilir. Kart testin numune damlatma alanında sıvı haldeki numune damlatılır (24). Dipstik testlerde damlatmaya gerek olmaksızın sıvı içine testin uç kısmının daldırılması yeterlidir. Teste uygulanan sıvının membranın sonuna kadar ilerlemesi gerekir. Aksi takdirde test geçersiz kabul edilir. Numune membranın sonuna kadar ulaştığında, membran yapısı gereği daha fazla numuneyi sürüklemeyebilir. Yaklaşık olarak 1 dakika içinde kontrol çizgisi alanında çizgi belirmeye başlar ve 5 dakika içinde bu çizgi net olarak oluşur. Herhangi bir nedenle kontrol çizgisi oluşmamişse test geçersizdir ve başka bir paket açılarak test tekrarlanmalıdır. Test çizgisi alanında testin sonucuna göre çizgi oluşur ya da oluşmaz. Testin üretim tekniğine göre çizginin varlığı pozitif veya negatif olarak değerlendirilir. Yarışmalı ve sandviç modellerin test sonuçları birbirine terstir, buna dikkat etmek gerekir. Sonucun nasıl yorumlanacağı testin plastik kaset kapağının üzerinde veya kullanım kılavuzunda mutlaka gösterilmiştir. Şekil 2’de kart test sonuçlarının yorumlanması gösterilmiştir (25).

İmmünokromatografik kart testlerin sonucunun yorumlanması için herhangi bir cihaz kullanım zorunluluğu yoktur. Çoğu zaman aslında kullanıcının gözü bu işlevi yerine getirir. Bu durum da kullanıcılar arasında yorum farkı nedeniyle sonucun subjektif olarak yanlış yorumlanmasına neden olabilir. Doğru olan, test çizgisi alanında görülen çizginin çok silik bile olsa var olduğunun kabul edilmesidir. Çünkü üretim tekniği gereğince bu testlerde bir eşik değer uygulanır ve bu uygulama ileride anlatılmıştır. Eğer numunedeki analit (aranılan madde) miktarı eşik değere çok yakın ise bu durumda test çizgisi alanında oldukça silik, belli belirsiz bir çizgi oluşur. Bu durumun kesin sonucu “numunedeki analit konsantrasyonunun eşik değere çok yakın olması” şeklinde yorumlanmalıdır. Şekil 3’te bu durum gösterilmiştir.

Yukarıda anlatılan kullanıcılar arası yorum farkına bağlı karışıklığı önlemek için bazı basit cihazların kullanımı söz konusu olmuştur. Bu cihazlar genel olarak oldukça ucuzdur, kullanımı kolaydır ve kredi kartı POS cihazı kadar küçük yapıya sahiptirler. Bunlar aslen renk farkı okuma cihazıdır ve bu sayede kullanıcı kaynaklı hatalar giderilebilir. Son yıllarda akıllı cep telefonlarının çıkmasıyla, bu cihazların kameraları sayesinde testin sonucunun yorumlanmasını sağlayan uygulamalar da geliştirilmiştir. Ayrıca daha rahat kullanım için akıllı gözlük modeli de geliştirilmiştir ve teknolojiye bağlı olarak yeni cihazlarla entegrasyon modellerinin araştırmaları devam etmektedir (25-28).



Şekil 3: Yarışmalı modelde üretilmiş panel tipi çoklu immünokromatografik kart testin silik görünen çizgilerin yorumlanması. A, B, C, D ve E şeritlerinde çift çizgi görünmektedir, sonuç negatiftir; F şeridinde sadece kontrol çizgisi görünmektedir, sonuç pozitifdir. C, D ve E şeritlerinin test çizgisinin silik olduğuna ve bu durumda da “çizgi var” olarak kabul edildiğine dikkat ediniz.

İMMÜNOKROMATOGRAFİK KART TESTLERİN ÇALIŞMA PRENSİBİ

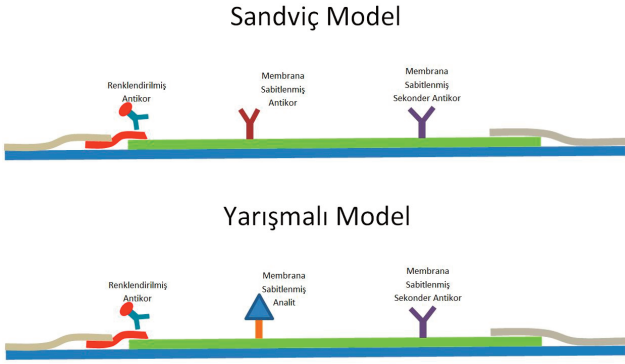
İmmünokromatografik kart testler, gözlem penceresindeki kontrol ve test çizgilerinde gözle görülebilen renkli çizgi bulunup bulunmamasına göre sonuç verirler. Normalde test yapılmadan önce bu alanda gözle görülebilen herhangi bir çizgi bulunmaz. Bu testlerde esas reaksiyon antijen-antikor kompleksinin oluşmasına bağlıdır. Genel olarak, antijen veya antikordan birisi kart testin zemininde bulunan nitroselüloz membrana sabitlenir, diğersinin ise reaksiyon pedinde hareketli kalması sağlanır. Bu hareket esnasında kompleks oluşur ve bu kompleksin varlığına veya yokluğuna göre sonuç yorumlanır (29, 30). Kart testlerde, test çizgisi alanında nitroselüloz zemine sabitlenen moleküllere göre, sandviç model ve yarışmalı model olmak üzere 2 farklı çalışma prensibi bulunmaktadır (Şekil 4). Sandviç model ilk üretilen testlerde kullanıldığı için buna ayrıca standart model veya konvansiyonel model de denir. Kontrol çizgisinin çalışma prensibi her iki modelde de aynıdır ve testin geçerliliğini kontrol etmeyi sağlar. (30)

Membrana moleküllerin sabitlenmesi

Kart testlerde, nitroselüloz membrandaki test çizgisine ve kontrol çizgisine bazı moleküllerin sabitlenmesi gerekmektedir. Kapiller akım sırasında bu moleküllerin hareket etmeden sabit olarak kalması sonucu, bu alanlarda renk oluşumu görülebilir. Bazı moleküller büyük protein yapısında oldukları için kendileri nitroselüloz membranda sürüklenmeden sabit kalabilmektedirler. Bu yapıdaki moleküllerde ayrıca bir yardımcı sabitleme molekülüne ihtiyaç duyulmaz. Ancak bazı moleküller küçük yapıdadır ve kapiller akım kuvvetiyle sürüklenirler. Bu moleküllerin sabit kalabilmesi için yardımcı büyük proteinler kullanılabilir. En sık kullanılan ajanlar albümin (bovine serum albumin) ve ovalbumindir. Bu ajanların nonselektif bağlanma bölgeleri nedeniyle, birçok moleküle bağ yapması mümkündür. Böylece, normal halde nitroselüloz membranda sabit kalamayan bir molekül, bu proteinlerle bağlandıktan sonra sabit olarak kalabilmektedir. Bunun yanında sükröz gibi bazı şeker molekülleri de kullanılabilir. Bu durumda membrana sabitlenecek olan molekül ile yardımcı sabitleme molekülünün bağ yapması öncelikle gereklidir. Bu bağ nonselektif olduğundan, çoğunlukla birkaç saat her iki molekülü aynı sıvı ortamında karıştırma ile sağlanabilir. Yardımcı molekül ile bağlanmış olan molekül nitroselüloz membrana uygulandıktan sonra, 10 saat gibi uzun bir süre bekletilmesinin ardından membranda sabit olarak kalabilmektedir. (31)

Sandviç Model (Konvansiyonel Model; Standart Model)

Sıklıkla kullanılan gebelik testleri bu modele göre üretilmektedir. Bu modelin uygulanabilmesi için, analitin birden fazla antijenik



Şekil 4: İmmüno-kromatografik kart testlerin sandviç ve yarışmalı modelinin şematik gösterimi.

determinant bölgeye sahip olması şarttır. Genel olarak bu model, protein yapısındaki büyük moleküller için daha uygundur. Bu modelde konjugat pedinde, renkli molekül bağlanarak renklendirilmiş olan analite spesifik monoklonal veya poliklonal antikor bulunmaktadır. Bu antikorlar reaksiyon pedinde sabit değildir ve gelen sıvı numune ile beraber bu renkli antikorlar da test çizgisine doğru sürüklenir. Test çizgisi alanına ise yine analite spesifik başka bir tür antikor sabitlenmiştir. Sandviç modelde, gözlem penceresinde çift çizgi görülürse sonuç pozitif; tek çizgi görülürse sonuç negatiftir (32).

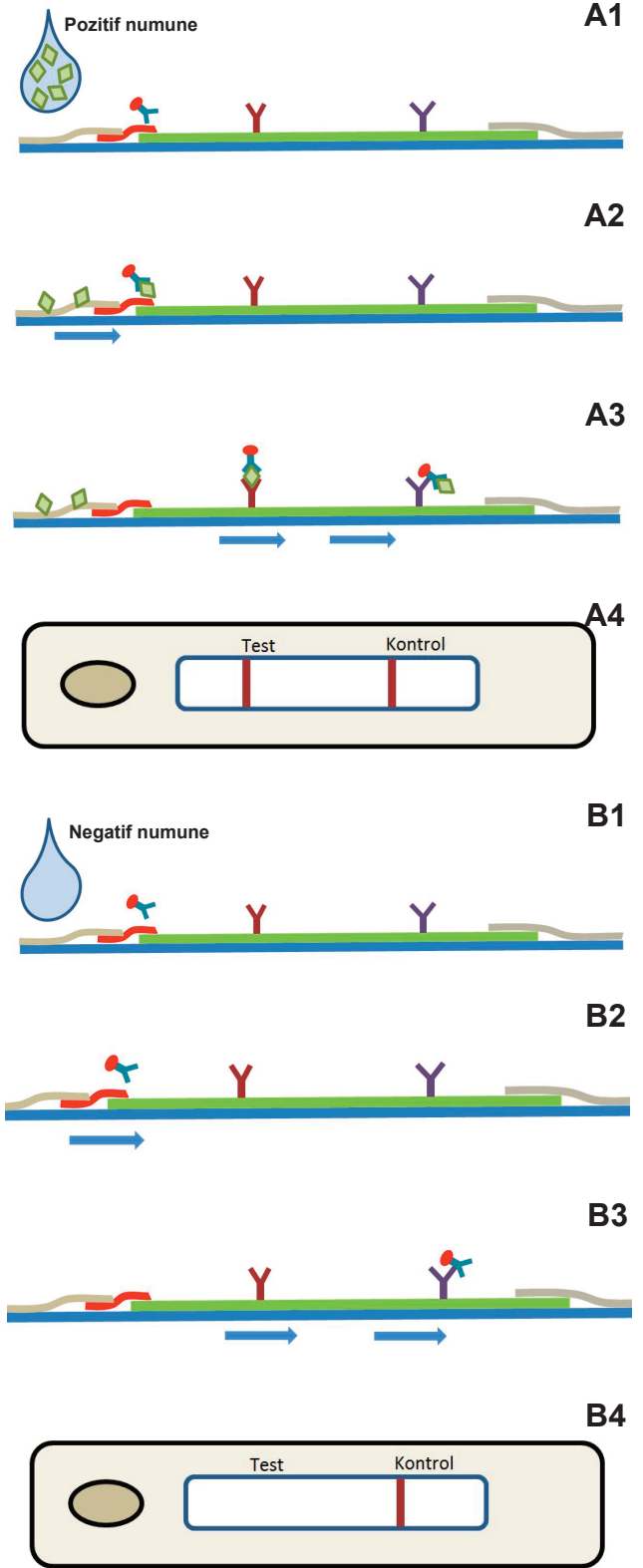
Sandviç modelde pozitif sonuç: Numunede aranan analit bulunuyorsa testin sonucunun pozitif olması beklenir. Bu sonuç şu şekilde gerçekleşir: Numunedeki analit, konjugat pedindeki renklendirilmiş spesifik antikoruna selektif olarak bağlanır ve numune ile birlikte analit-antikor-renk molekülü kompleksi, test çizgisine doğru ilerler. Numune ile birlikte test çizgisine gelen bu kompleksteki analit, test çizgisine sabitlenmiş antikorlara da bağlanarak, test çizgisi alanında gözle görülebilen renkli bir çizgi oluşumunu sağlar. Testin geçerli olduğu her durumda kontrol çizgisinde renk oluşacağından sandviç modelin pozitif sonucunda gözlem penceresinde çift çizgi görülür.

Sandviç modelde negatif sonuç: Numunede aranan analit bulunmuyorsa testin sonucunun negatif olması beklenir. Bu sonuç şu şekilde gerçekleşir: Numunede analit olmadığından, konjugat pedindeki renkli antikora bağlanma olmaz. Bu antikorlar numune ile beraber sürüklenerek test çizgisi alanına geldiklerinde, test çizgisindeki sabitlenmiş antikorlara bağlanmazlar ve ilerleyerek atık pedinde birikirler. Atık pedi kapalı alanda olduğundan herhangi bir renkli çizgi görülmez. Testin geçerli olduğu her durumda kontrol çizgisinde renk oluşacağı için, sandviç modelin negatif sonucunda gözlem penceresinde tek çizgi görülür ve bu kontrol çizgisidir (32, 33) (Şekil 5).

Yarışmalı model

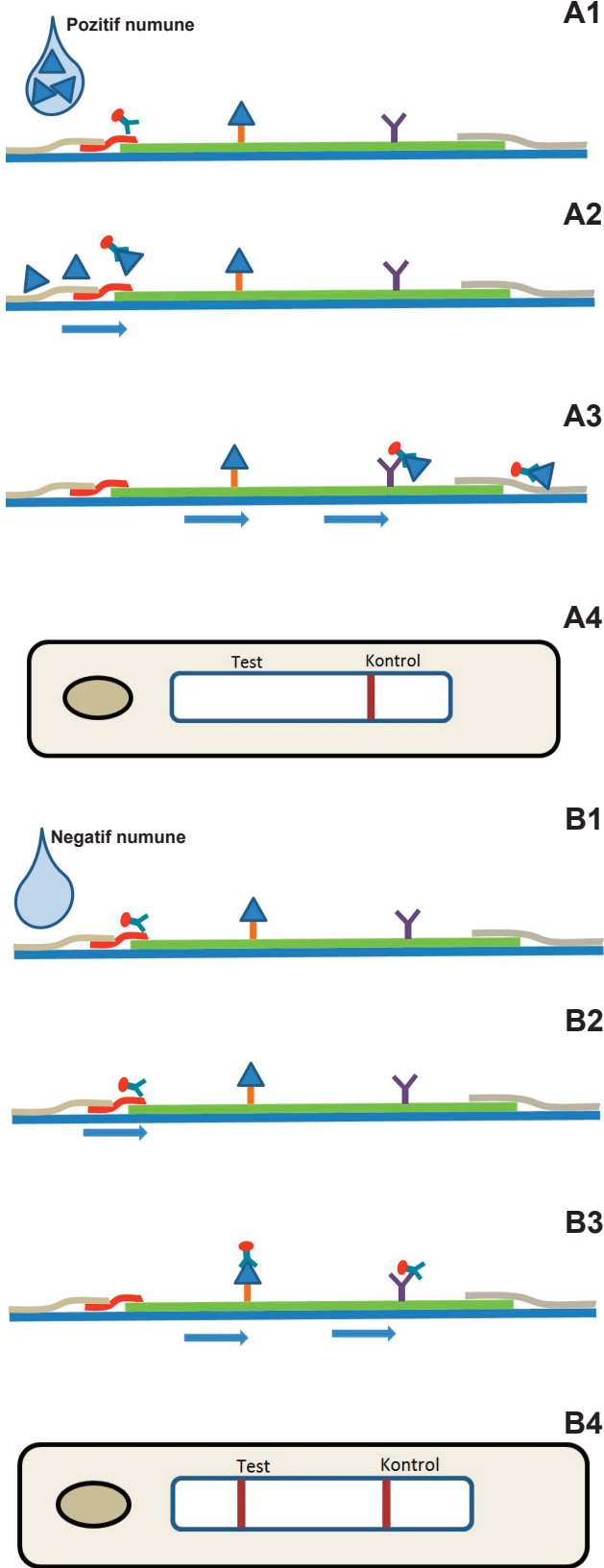
Bu model, sadece tek bir antijenik determinant bölgeye (antikor oluşturulabilen bölge) sahip ve sıklıkla küçük moleküler yapı analitler için daha uygundur. Bu modelde konjugat pedinde renkli molekül bağlanarak renklendirilmiş analite spesifik monoklonal antikor bulunur. Bu antikorlar sabit değildir ve gelen sıvı numune ile beraber bu renklendirilmiş antikorlar da test çizgisine doğru sürüklenir. Test çizgisi alanına ise, analiz edilmek istenen analitin kendisi sabitlenmiştir. Yarışmalı modelde, gözlem penceresinde tek çizgi görülürse sonuç pozitif; çift çizgi görülürse sonuç negatiftir. Bu özelliği ile anlatılan modeller birbirine ters şekilde sonuç verir ve pratik uygulama sırasında dikkat edilmesi gerekir (32, 33).

Yarışmalı modelde pozitif sonuç: Numunede aranan analit bulunuyorsa testin sonucunun pozitif olması beklenir. Bu sonuç şu şekilde gerçekleşir: Numunedeki analit, konjugat pedindeki renklendirilmiş spesifik monoklonal antikoruna selektif olarak



Şekil 5: Sandviç model kart testin çalışma prensibi. Pozitif (A) ve negatif (B) sonucunun oluşumunu sağlayan moleküllerin şematik gösterimi. İşleyişin anlaşılması için tüm işlevsel moleküller gösterilmiştir, testin uygulanmasında ise sadece kırmızı yuvarlak olarak şematize edilenler gözle görülebilir.

bağlanır ve numune ile birlikte analit-antikor-renk molekülü kompleksi test çizgisine doğru ilerler. Numune ile birlikte test çizgisine gelen bu kompleksteki monoklonal antikor, test çizgisine sabitlenmiş aynı analite bağlanamaz, çünkü numunede bulunan



Şekil 6: Yarışmalı model kart testin çalışma prensibi. Pozitif (A) ve negatif (B) sonucun oluşumunu sağlayan moleküllerin şematik gösterimi. İşleyişin anlaşılması için tüm işlevsel moleküller gösterilmiştir, testin uygulanmasında ise sadece kırmızı yuvarlak olarak şematize edilenler gözle görülebilir.

A1

analit ile bağlanarak bağlanma bölgesi kapatılmıştır. Böylece test çizgisi alanında renkli bir çizgi oluşmaz. Testin geçerli olduğu her durumda kontrol çizgisinde renk oluşacağı için, yarışmalı modelin pozitif sonucunda gözlem penceresinde tek çizgi görülür.

A2

Yarışmalı modelde negatif sonuç: Numunedeki analit bulunmuyorsa testin sonucunun negatif olması beklenir. Bu sonuç şu şekilde gerçekleşir: Numunedeki analit olmadığından, konjugat pedindeki renklendirilmiş spesifik monoklonal antikorlar herhangi bir bağ yapmazlar ve bağlanma bölgeleri açık kalır. Numune ile birlikte renklendirilmiş antikor test çizgisine doğru ilerler. Numune ile birlikte test çizgisine gelen monoklonal antikorlar test çizgisine sabitlenmiş analite bağlanırlar, çünkü numunedeki analit bulunmadığından antikorların bağlanma bölgeleri halen açıktır. Böylece test çizgisi alanında renkli bir çizgi oluşur. Testin geçerli olduğu her durumda kontrol çizgisinde de renk oluşacağı için, yarışmalı modelin negatif sonucunda gözlem penceresinde çift çizgi görülür (34, 35) (Şekil 6).

A3

Her iki modelde kontrol çizgisinde renk oluşumu

Kart teste uygulanan numune miktarı yetersiz olursa test sonucu yanlış yorumlanabilir. Bunu engellemek için her teste kontrol çizgisi eklenir ve bu çizgi daima test çizgisinden daha ileriye yerleştirilir. Bu yerleşim nedeniyle, öncelikle numune test çizgisine ulaşır ve daha sonra kontrol çizgisine ulaşır. Böylece numunenin test çizgisine ulaştığından emin olunur. Her iki modelde de, sonucun pozitif veya negatif olmasına bağlı olmaksızın, kontrol çizgisinde her zaman renk oluşmalıdır. Bu çizginin görülmesi ile numunenin yeterli olduğu ve testin geçerli olduğu anlaşılır.

A4

Kontrol çizgisindeki renk oluşumu her iki modelde de aynı şekilde gerçekleşir. Kontrol çizgisinde nitroselüloz membrana bağlanacak antikor, test için kullanılan antikorun ürettiği hayvana göre değişiklik gösterir. Test için kullanılan ve konjugat pedinde bulunan antikorlar hangi hayvandan üretilmişse ve hangi tipte immünglobulin yapısına sahip ise, ona karşı başka hayvanda üretilmiş sekonder antikorlar kontrol çizgisine sabitlenir. Örnek olarak; gebelik testlerinde hedef analit olan Beta-HCG molekülüne spesifik antikorlar eğer farede üretilmiş ve IgG yapısında ise, kontrol çizgisine "fare IgG'ye spesifik keçi antikor" kullanılabilir. Konjugat pedine, test çizgisine sabitlenen molekül sayısından çok daha fazla sayıda renkli antikor eklendiğinde, test çizgisinden artan antikorlar kontrol çizgisine gelerek burada renkli çizgi oluştururlar. (32-37)

B1

İMMÜNOKROMATOGRAFİK KART TEST ÜRETİMİ

İmmünokromatografik kart test üretimi için bazı laboratuvar gereçleri, üretim makineleri, analite spesifik antikorlar ve analitin kendisi, renkli nanopartiküller (altın nanopartikülü), sabitleyici moleküller (bovine serum albümine veya ovalbümine), nitroselüloz membran, pedler, plastik tabanlık ve kaset malzemeleri gereklidir (32).

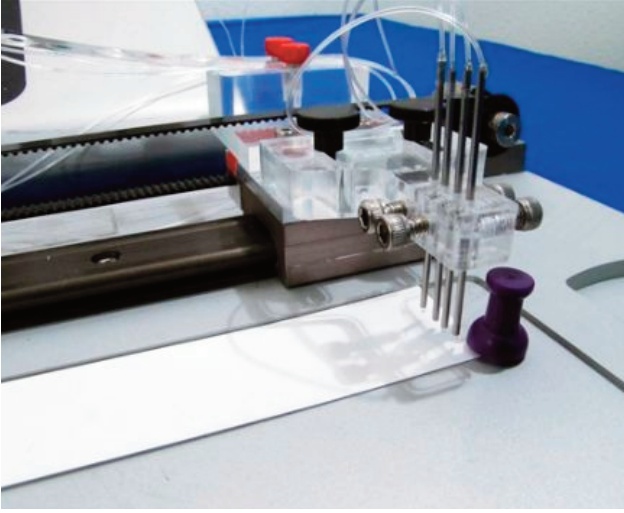
B2

Üretim Makineleri:

İmmünokromatografik kart testlerin AR-GE çalışmaları zahmetli olmakla birlikte, seri üretimi oldukça kolaydır. Araştırma amaçlı olarak az sayıda (örneğin 100 test/gün) test üretilmesi gerektiğinde temel laboratuvar imkanları yeterli olabilir. Bu aşamada en önemli işlemlerden biri, membrana uygulanan test ve kontrol çizgilerinin ince, düzgün ve homojen olarak çizilmesidir. Bu iş için bazı cihazlar bulunmaktadır. Temel olarak çok küçük hacimde enjeksiyonu sabit hızda yapan cihazlar kullanılmaktadır. Otomatik perfüzyon makineleri de bu amaçla kullanılabilir. Bu işlemde, bir taraftan sabit hızda enjeksiyon ile membrana sıvı uygulanırken, diğer taraftan membran sabit hızla hareket ettirilerek, membran üzerine ince ve düzgün bir çizgi halinde sıvının uygulanması mümkün olmaktadır (Şekil 7). Daha sonra membrana uygulanan sıvının kurutulması

B3

B4



Şekil 7: İmmünokromatografik kart test üretiminde membran üzerine çizgi uygulaması.

için uygun bir kurutucu ortam kullanılabilir. Sonraki aşamada testlerin 5-6 mm kalınlığında şerit halinde kesilmesi gerekir. Bu şeritler daha sonra plastik kaset kapakların arasına alınarak kapak kapatılır. Son aşamada ışık ve nem geçirmez bir ambalaj ile her test tek tek paketlenir. Bu üretim için gerekli cihazların maliyeti yaklaşık olarak 2000 USD dolayındadır (32, 38).

Daha büyük ölçekli üretimlerde ise (örneğin 1000 test/gün) bazı makinaların kullanılması gerekebilir. Bunlar kart test çizici (dispenser), kurutucu, kart test kesici ve paketleyici makinalarıdır. Bu makinalar yukarıda anlatılan işlemleri daha hızlı bir şekilde yapmak üzere tasarlanmıştır. Kart test üretimini az da olsa sürekli olarak yapan birimlerde bu cihazların olması yeğlenir. Bu cihazlarla donatılan üretim yerlerinde günde birkaç bin adet immünokromatografik kart test üretilmesi mümkündür. Bu makinaların tamamının yaklaşık maliyeti ortalama 40000 USD kadardır.

Çok daha büyük ölçekli üretimlerde ise (5000 test/gün ve daha fazla) yukarıdaki işlemlerin tamamını sıraya göre yapan otomatik makinaların kullanımı gerekmektedir. Bu makinaların bir adedinin maliyeti yaklaşık olarak 150000 USD dolayındadır (32, 38).

RENKLİ MOLEKÜLLER

Aslında immünokromatografik testlerin gözle direk görülemeyen şekilleri de vardır ve bunların sonucunun yorumlanması için ayrıca bir cihaz gerekir. Floresan antikorlar bunun en sık kullanılan örneğidir. İmmünokromatografik kart testlerde bu tip bir cihaz yerine insan gözünün görme yeteneğinin kullanıldığını düşünebiliriz. Böylece başka bir dedeksiyon cihazına gerek kalmamaktadır. İmmünokromatografik kart testlerin sonucu gözle görülerek yorumlandığından, test üzerinde gözle görünür bir farklılık olması gerekir. Gözle görülebilmek içinse materyalin görünür ışık dalga boyuna sahip olması gerekmektedir. Bu testlerde kullanılan antikorlar gözle görülmediğinden bu antikorların gözle görünür bazı moleküllerle desteklenmesi gerekir. Karbon nanopartikülleri, koloidal selenyum, manyetik nanopartiküller, gümüş nanopartikülleri, platin nanopartikülleri bu alanda nadiren kullanılabilir. Bu amaçla en sık kullanılan renklendirici madde ise altın atomu kaynaklıdır. Altın nanopartikülleri veya koloidal altın ismiyle sıklıkla kullanılır (1). Altın partiküllerinin kart testlerde kullanımı ilk olarak 2002 yılında tanımlanmıştır (9). Bu nanopartiküllerin sentezi kolay, stabilitesi yeterli, manipülasyonu mümkündür ve molekül boyutları ayarlanabilir. Altın nanopartikülleri çıplak gözle rahatlıkla görülebilen kırmızı tonlarında bir renk oluşumu sağlar.

Dedeksiyon limitine göre görülen renk pembe-kırmızı-mor arasında değişkenlik gösterir. Antikorlar dışında DNA ve aptamerler gibi biyomoleküllerle, toksinler ve katyonik metaller gibi moleküllerle de rahatlıkla bağlanabilir. Bu özellikleri sayesinde günümüzde immünokromatografik kart testler için en uygun renklendirici molekül olarak bilinmektedir. Altın nanopartikülleri, altın madeninden elektrolizle veya sıvı içinde kloroaurik asitin indirgenmesi yöntemiyle kolayca elde edilebilmektedir (1, 9, 39).

Renkli molekül seçimini kısıtlayan önemli faktörlerden biri de renkli molekülün antikora bağlanmasıdır. Altın nanopartikülleri bu alanda başarılı oldukları için de sıkça tercih edilirler. Altın nanopartiküllerinin antikor gibi büyük biyomoleküllere bağlanması oldukça kolaydır. Genellikle belli bir sıvı ortamda bir süre karıştırılarak bekletildiğinde bağlanma gerçekleşir (1, 39).

NUMUNEDEKİ ANALİTİ TANIYAN MOLEKÜLLER

Bir numunede herhangi bir analitin analizinin yapılması gerektiğinde en önemli sorunlardan birisi ayırıştırma değildir. Numune içinde genellikle analit dışında birçok madde bulunur. Analiz yapılması için öncelikle bu diğer maddelerden kurtulmak gerekir. Kromatografik yöntemler esas olarak bu amaçla kullanılır. Böylece analizden önce saflaştırma işlemi gerçekleştirilir. Ancak saflaştırma her zaman yeterli düzeyde olmayabilir (40). Bir numunedeki analiti diğer maddelerden saflaştırmadan analiz etmek de mümkündür. Bu durumda analiti seçici olarak tanıyan özel bir molekül gerekir. Günümüzde kromatografi dışındaki birçok analiz yöntemi bu esasa göre çalışır. Burada en önemli sorun seçiciliktir. Moleküler yapılarda bilinen seçici moleküller aslen biyolojik kaynaklı olan antijen-antikorlar, enzim-substratlar ve reseptör-ligantlar olarak karışımıza çıkar (1). Biyokimyasal analiz yöntemlerinde enzim-substrat ilişkisi oldukça sık kullanılırken reseptör-ligant yapısı ise oldukça sınırlı şekilde kullanılır. ELISA ve immünokromatografik testlerde ise antijen-antikor kompleksi kullanılır. Bu yapının seçiciliği sayesinde, numune içinde birçok başka molekül olmasına rağmen, sadece istenen molekülün miktarı belirlenebilir. Böylece testlerin seçicilik oranı %99'lara çıkar (29, 41).

ANTİKOR ÜRETİMİ

Köhler ve Milstein isimli iki immünolog 1975 yılında monoklonal antikor üretimi konusunda yeni bir yöntem tanımlamışlar ve 1984 yılında bu yöntemleriyle Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir (42). Antikor üretimi başlı başına ayrı bir konu olup, bu derlememizin esas konusunu teşkil etmediğinden kısaca değinilmiştir. Bu yöntemde öncelikle deney hayvanına (sıklıkla fare) antijenik molekül enjekte edilir. Sonra hayvanın B lenfositlerini uyarmak için komplet ve inkomplet Freud adjuvanları belli bir protokole göre toplam 1 aya yakın süre uygulanır. Daha sonra farenin dalağı alınarak, dalaktaki B hücreleri izole edilir ve bu hücrelerin başka myeloma hücreleri ile hibrit oluşturması sağlanır. Oluşan yeni hibrit hücreler hem antikor üretir hem de kanser özelliği sayesinde sürekli olarak ürerler. Bu hücrelerden, ihtiyaç duyulan antikorları üretenler ELISA yöntemi ile tespit edilerek bu hücrelerin üretimi sağlanır. Üretilen ve seçilen bu yeni hücreler istenen monoklonal antikorları saf olarak üretmektedirler. Bu hücreler hücre kültürü vasatında üretilir ve hücre kültürü ortamında salgıladıkları monoklonal antikorlar saflaştırma yöntemleriyle elde edilir (43).

NİTROSELÜLOZ MEMBRAN VE DİĞER MATERYAL

Kimyasal madde olarak nitroselüloz, bir asırdan fazla süredir yaşantımızdadır. İmmünokromatografik kart test yapısında kullanılan materyallerin en önemlilerinden biri nitroselüloz membrandır. Bu membran mikro gözeneklere sahip bir yapıdadır. Bu gözenekler sayesinde membran üzerinde numune sıvısı ile

birlikte moleküller de ilerler. Membranın yapısı bazen çok büyük moleküllerin ilerlemesine imkan vermeyebilir. Ayrıca su dışında başka sıvıları içeren numunelerin kapiller akım hızları ve kapasiteleri de farklılıklar gösterebilir. Böyle durumlarda farklı gözenek büyüklüğüne sahip nitroselüloz membranlar denenecek en iyi verimin alındığı tür tercih edilmelidir. Çoğunluğu su olan sıvı içeren numunelerde 3-20 mikrometre arası gözenek yapılı membranlar sıklıkla kullanılır. Kart testin yapısında kullanılan numune pedi ve atık pedi selüloz yapısındadır. Reaksiyon pedi ise nanopartikülleri bozmadığından ve büyük molekülleri bağlamayarak hareketli kalmalarına izin verdiği için fiber glass materyalden yapılmıştır (3, 44).

DEDEKSİYON LİMİTİ VE EŞİK DEĞER

Her tür analiz yönteminde bir dedeksiyon limiti (analiz edilebilen en az analit düzeyi) bulunur. Bu limit, testin güvenle tanıyabildiği en alt değer olarak tanımlanır ve bu değer altında o yöntem sonuç veremez. Genel bir bakışla, dedeksiyon limiti en düşük olan test yönteminin daha kullanışlı olduğu söylenebilir. Genelde laboratuvar analiz yöntemlerinin nanogram/mililitre düzeylerine kadar inebildiği görülür. Son yıllarda gelişen kütle spektrometrisi sayesinde çok daha alt limitlere inilmesi de mümkün olmuştur. Dedeksiyon limitinin yetersiz olması durumunda o testin kullanımını mümkün değildir. Birçok testin her bir analit için dedeksiyon limiti sabit bir değerdir. İmmünokromatografik kart testlerin de diğer testler gibi bir dedeksiyon limiti bulunmaktadır. Bu testlerin sonucunun yorumlanması gözle izlemeye bağlı olduğundan, dedeksiyon limiti de oluşan çizginin gözle görülebilmesi ile sınırlanır. Çalışmalara göre, kart testlerin dedeksiyon limitinin bazı analitlerde 10 ng/ml düzeylerine kadar inebildiği görülmüştür. Genel olarak bu testlerin dedeksiyon limitlerinin 10-50 ng/ml arasında olduğu bilinmektedir. Aslında kart testler çok düşük alt limitlere kadar inebilmektedir ancak, bu durumda renk farkı gözle ayırt edilemediğinden yukarıda bildirilen limitler güvenli sınır olarak görülmektedir. Dedeksiyon limitinin yeterliliğini belirleyen faktör, numunede bulunan analitin beklenen konsantrasyonudur. Birçok analizde numunede analit konsantrasyonu kart testlerin dedeksiyon limitlerinin oldukça üzerindedir. Bu hali ile immünokromatografik kart testlerin dedeksiyon limitlerinin birçok analit ve numune için uygun olduğu görülmektedir (1, 45).

İmmünokromatografik kart testler kalitatif sonuç verirler. Bu durumda pozitif-negatif sınırını belirleyen bir eşik değer olması gerekir. Bu değer numuneye ve analite göre değişmektedir. Testler bu değer altındaki konsantrasyonlarda negatif sonuç vermeli, üzerindeki konsantrasyonlarda ise pozitif sonuç vermelidir. Örneğin, esrar taramasında kullanılan nor-9-tetrahidrokannabinol metabolitinin idrardaki eşik değeri birçok ülkede 50 ng/ml olarak belirlenmiştir. Aslında bu metabolit için kart testlerin dedeksiyon limiti daha düşüktür, bu durumda kart testlerde eşik değer dedeksiyon limitinden daha yüksek bir değere ayarlanmaktadır. İmmünokromatografik kart testlerde eşik değer ayarlanması, test çizgisine sabitlenen molekül miktarı ile sağlanır. Bu çizgiye sabitlenen molekül konsantrasyonu artırılarak eşik değer istendiği kadar yükseltilebilir. Eşik değerinin alt limiti ise yine dedeksiyon limiti ile sınırlıdır, daha alt değerlere inilmesi mümkün değildir. İhtiyaca göre ayarlanmış olan eşik değer testlerin validasyonu sırasında teyit edilir (1, 45).

İmmünokromatografik kart testlerle kantitatif analiz yapmak şimdilik mümkün değildir. Ancak teste birden fazla eşik değer uygulanırsa yarı kantitatif test üretilmesi mümkündür. Bu durumda en düşük eşik değer test çizgisi, reaksiyon pedine yakın olacak şekilde küçükten büyüğe doğru test çizgileri sıralanır. En son sıraya ise kontrol çizgisi yerleştirilir. Böyle bir test ile yapılan analizin sonucu "numunede x ile y arasında konsantrasyonda

analit bulunmaktadır" şeklinde verilebilir. Bu şekilde sonuç verilmesine yarı kantitatif denilmektedir (39, 46, 47).

VALIDASYON ÇALIŞMALARI

İmmünokromatografik kart test üretimi tamamlandıktan sonra piyasaya sürmeden önceki son aşamada validasyon çalışmalarının (testin geçerlilik ve doğruluk çalışmaları) yapılması gerekir. Bir testin sadece validasyon çalışması bile başlı başına bir makale konusu olabilmektedir. Validasyon çalışmalarının genel esasları benzer olmakla birlikte, kullanım alanına göre bazı farklılıklar olabilir. Örneğin, gebelik testinde duyarlık %95 sınırında kabul edilebilirken, hayatı tehdit eden bir toksin analizi için geliştirilen testte duyarlık %99'un üzerinde olmalıdır. Validasyon çalışmalarında istatistik biliminin ilkelerine göre hareket edilmesine dikkat edilmelidir. Genel olarak bakıldığında, immünokromatografik kart testlerin validasyon parametrelerinin %98'in üzerinde olduğu görülmektedir. Bu oran başka analiz yöntemleriyle kıyaslandığında oldukça güçlüdür (1).

Validasyon çalışmalarının esası negatif veya pozitif olduğu bilinen numunelerin yeni test ile analizine dayanır. Bu nedenle numuneleri analiz etmek için öncelikle başka bir altın standart yöntem olması gerekir. Yeni üretilen kart testin validasyon verileri bu altın standart yöntemle oranla ifade edilir. Validasyon çalışmaları amacıyla çoğunlukla duyarlılık, seçicilik, eşik değer kontrolü, gün içi değişkenlik, günler arası değişkenlik, kullanıcılar arası değişkenlik, stabilite çalışmaları yapılması gerekmektedir (47, 48).

Validasyon testleri için gerekli numune sayıları, istenen güç oranına göre istatistiksel hesaplamalarla bulunur. Validasyon çalışmalarında, kart testin kullanım amacına uygun numuneler kullanılır. Örneğin bir kart test inek sütünde toksin analizi için geliştirilmişse, validasyon çalışmalarında da inek sütü kullanılmalıdır.

Duyarlılık; bir testin pozitif olan numuneleri pozitif olarak belirleme oranıdır. Örneğin yeni üretilen bir testte 100 adet pozitif numune analiz edildiğinde, 96 tanesinde pozitif sonuç veriyorsa bu testin duyarlılığı %96'dır. Seçicilik; bir testin negatif olan numuneleri negatif olarak belirleme oranıdır. Yine örnek olarak yeni üretilen bir testte 100 adet negatif numune analiz edildiğinde, 95 tanesinde negatif sonuç veriyorsa bu testin seçiciliği %95'dir. Gün içi değişkenlik ve günler arası değişkenlik için de yeterli sayıda pozitif ve negatif numuneler alınarak analizi yapılır ve analiz sonuçlarının arasındaki korelasyon hesaplanır. Ayrıca testin kullanım profiline uygun kullanıcılar arasından yeterli sayıda kişinin testleri kullanması sağlanarak kişiler arası değişkenlik de hesaplanır (47, 48).

Testlerin üretimi sırasında eşik değer uygulaması yukarıda anlatılmıştır. Bu değer altında ve üstünde olmak üzere yakın değerlere sahip pozitif ve negatif numuneler yeterli sayıda analiz edilerek, eşik değere ne kadar yakın değerlerin analiz edilebildiği test edilir. Eğer kart test yarı kantitatif olarak üretilmişse; bu durumda birden fazla eşik değer vardır. Her bir eşik değer alt ve üst konsantrasyonlarında numuneler analiz edilerek test değerlendirilmelidir.

Stabilite testleri için öncelikle testin saklama koşulları belirlenmelidir. Genel olarak kart testler ortalama oda sıcaklığında (25 °C) saklanabilmektedirler. Testler hangi sıcaklıkta saklanacak ise o sıcaklığı sürekli olarak sağlayan ortamda yeterli sayıda test saklanır ve belli aralıklarla pozitif ve negatif numuneler analiz edilir. Böylece testin geçerli validasyon parametrelerini ne kadar süre koruduğu bulunur. Örnek olarak ilk 6 ay boyunca her ayda bir defa, daha sonra 3 ayda bir analizler gerçekleştirilebilir. İhtiyaca göre analiz aralıkları değiştirilebilir (47, 48).

Sonuç olarak; tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de birçok farklı immünokromatografik kart testler kullanılmaktadır. Çoğunlukla

bu testler yurt dışında üretilmektedir. Yeni bir analit için immünokromatografik kart test üretmeyi planladığımız bir çalışma kapsamında ülkemizde bu konudaki bilgi birikiminin oldukça yetersiz olduğu gözlemlenmiştir. Sadece birkaç üretici firma daha önceden geliştirilmiş gebelik testi gibi bazı kart test üretmektedir. Araştırmamıza göre ülkemizde hiç yeni bir kart test üretilmediği görülmektedir. Birkaç yıldır yaptığımız araştırmalardan elde ettiğimiz bilgi birikiminin bu derleme aracılığıyla aktarılmasının, ülkemizdeki bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlayacağı kanaatindeyiz. Ülkemizde zaman zaman önemli sağlık problemlerinden olan Kırım-Kongo kanamalı ateşi ve tehlikeli grip türleri için erken tanı; deli bal toksini, toksik bazı bitkiler, mantarlar ve doğal ürünlerin tanınması için immünokromatografik kart test üretiminin önemli olacağını düşünüyoruz. Derlemenin söz konusu alanlarda çalışan ve bu amaçla yeni test ürünleri geliştirmek isteyen genç bilim insanlarına bir kılavuz olacağı inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Quesada-González D, Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2015; 25;73:47-63.
2. Offermann N, Conrad K, Fritzier MJ, Fooker Achterath M. Development and validation of a lateral flow assay (LFA) for the determination of IgG-antibodies to Pr3 (cANCA) and MPO (pANCA). *J Immunol Methods.* 2014; 31;403(1-2):1-6.
3. Chen A, Yang S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosens Bioelectron.* 2015; 15;71:230-242.
4. Tallent SM, Hait JM, Bennett RW. Analysis of *Bacillus cereus* toxicity using PCR, ELISA and a lateral flow device. *J Appl Microbiol.* 2015; 118(4):1068-75.
5. Khunthong S, Jaroenram W, Arunrut N, Suebsing R, Mungsantisuk I, Kiatpathomchai W. Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods.* 2013; 188(1-2):51-6.
6. Song LW, Wang YB, Fang LL, Wu Y, Yang L, Chen JY, Ge SX, Zhang J, Xiong YZ, Deng XM, Min XP, Zhang J, Chen PJ, Yuan Q, Xia NS. Rapid fluorescent lateral-flow immunoassay for hepatitis B virus genotyping. *Anal Chem.* 2015; 19;87(10):5173-80.
7. Rosand C. Paper-based analytical devices for point-of-care infectious disease testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(2):147-56.
8. Clark Jr, LC, Wolf R, Granger D, Taylor Z. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of applied physiology.* 1953; 6(3):189-193.
9. Shyu RH, Shyu HF, Liu HW, Tang SS. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon.* 2002; 40(3):255-8.
10. Mazumdar D, Liu J, Lu G, Zhou J, Lu Y. Easy-to-use dipstick tests for detection of lead in paints using non-cross-linked gold nanoparticle-DNAzyme conjugates. *Chem Commun (Camb).* 2010; 7;46(9):1416-8.
11. Torabi SF, Lu Y. Small-molecule diagnostics based on functional DNA nanotechnology: a dipstick test for mercury. *Faraday Discuss.* 2011; 149:125-35.
12. Kuang H, Xing C, Hao C, Liu L, Wang L, Xu C. Rapid and highly sensitive detection of lead ions in drinking water based on a strip immunosensor. *Sensors (Basel).* 2013; 28;13(4):4214-24.
13. López Marzo AM, Pons J, Blake DA, Merkoçi A. High sensitive gold-nanoparticle based lateral flow Immunodevice for Cd²⁺ detection in drinking waters. *Biosens Bioelectron.* 2013; 15;47:190-8.
14. Cimaglia F, Liandris E, Gazouli M, Sechi L, Chiesa M, De Lorenzis E, Margarita A, Taka S, Mataragka A, Ikononopoulos J. Detection of mycobacterial DNA by a specific and simple lateral flow assay incorporating cadmium selenide quantum dots. *Mol Cell Probes.* 2015; 9;S0890-8508(15)30014-1.
15. Nauen R, Wölfel K, Lueke B, Myridakis A, Tsakireli D, Roditakis E, Tsagkarakou A, Stephanou E, Vontas J. Development of a lateral flow test to detect metabolic resistance in *Bemisia tabaci* mediated by CYP6CM1, a cytochrome P450 with broad spectrum catalytic efficiency. *Pestic Biochem Physiol.* 2015; 121:3-11.
16. Kim J, Adhikari M, Dhamane S, Hagström AE, Kourentzi K, Strych U, Willson RC, Conrad JC. Detection of viruses by counting single fluorescent genetically biotinylated reporter immunophage using a lateral flow assay. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015; 4;7(4):2891-2898.
17. Tang MW, Clemons KV, Katzenstein DA, Stevens DA. The cryptococcal antigen lateral flow assay: A point-of-care diagnostic at an opportune time. *Crit Rev Microbiol.* 2015 Jan 23:1-9.
18. Deng J, Pei J, Gou H, Ye Z, Liu C, Chen J. Rapid and simple detection of Japanese encephalitis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods.* 2015 Mar;213:98-105.
19. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Jan;393(2):569-582.
20. Shi CY, Deng N, Liang JJ, Zhou KN, Fu QQ, Tang Y. A fluorescent polymer dots positive readout fluorescent quenching lateral flow sensor for ractopamine rapid detection. *Anal Chim Acta.* 2015 Jan 7;854:202-208.
21. McGrath J, Jimenez M, Bridle H. Deterministic lateral displacement for particle separation: a review. *Lab Chip.* 2014 Nov 7;14(21):4139-58.
22. Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, D'Arco G, Giraudi G. Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review. *Anal Bioanal Chem.* 2013 Jan;405(2-3):467-80.
23. Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins GR, Lipp M, Shan G, Stave JW, Pantella V. Immunoassay as an analytical tool in agricultural biotechnology. *J AOAC Int.* 2006 Jul-Aug;89(4):913-928.
24. Rosen S. Market Trends in Lateral Flow Immunoassays, Lateral Flow Immunoassay. Springer, 2009, USA.
25. Faulstich K, Gruler R, Eberhard M, Lentzsch D, Haberstroh K. Handheld and Portable Reader Devices for Lateral Flow Immunoassays, Lateral Flow Immunoassay. Springer, 2009, USA.
26. Lee S, Kim G, Moon J. Development of a Smartphone-based reading system for lateral flow immunoassay. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014 Nov;14(11):8453-8457.
27. Smits HL, Eapen CK, Sugathan S, Kuriakose M, Gasem MH, Yersin C, et al. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8;166-

- 169.
28. Feng S, Caire R, Cortazar B, Turan M, Wong A, Ozcan A. Immunochromatographic diagnostic test analysis using Google Glass. *ACS Nano*. 2014 Mar 25;8(3):3069-79.
 29. Costa MN, Veigas B, Jacob JM, Santos DS, Gomes J, Baptista PV, Martins R, Inácio J, Fortunato E. A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper. *Nanotechnology*, 2014;25,1-12.
 30. Zhang C, Zhang Y., Lateral flow colloidal gold-based immunoassay for pesticide. *Methods Mol Biol*. 2009;504:237-252.
 31. Liu Y, Wu A, Hu J, Lin M, Wen M, Zhang X, Xu C, Hu X, Zhong J, Jiao L, Xie Y, Zhang C, Yu X, Liang Y, Liu X. Detection of 3-phenoxybenzoic acid in river water with a colloidal gold-based lateral flow immunoassay. *Anal Biochem*. 2015 Aug 15;483:7-11.
 32. Sajid M, Kawde AN, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2014; (ahead of print).
 33. Qian S, Bau HH. A mathematical model of lateral flow bio-reactions applied to sandwich assays. *Analytical Biochemistry*, 2003; (ahead of print).
 34. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Amerongen AV. Development of a competitive lateral flow immunoassay for progesterone: influence of coating conjugates and buffer components. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Nov;392(6):1215-1223.
 35. Haim HB, Qian S. Analysis of lateral flow biodetectors: competitive format. *Penn Libraries*, 2003, USA.
 36. Barnett JM, Wraith P, Kiely J, Persad R, Hurley K, Hawkins P, Luxton R. An Inexpensive, Fast and Sensitive Quantitative Lateral Flow Magneto-Immunoassay for Total Prostate Specific Antigen, *Biosensors*, 2014; Jul 8;4(3):204-220.
 37. Chen C, Wu J. A Fast and Sensitive Quantitative Lateral Flow Immunoassay for Cry1Ab Based on a Novel Signal Amplification Conjugate. *Sensors (Basel)*. 2012;12(9):11684-11696.
 38. Delilah G. Lateral Flow Assembly (LFA). *Ginolis*, 2014, USA.
 39. He L, Nan T, Cui Y, Guo S, Zhang W, Zhang R, Tan G, Wang B, Cui L. Development of a colloidal gold-based lateral flow dipstick immunoassay for rapid qualitative and semi-quantitative analysis of artesunate and dihydroartemisinin. *Malar J*. 2014 Mar 31;13:127.
 40. Krueve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, Ravió P, Leito I. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part I. *Anal Chim Acta*. 2015 Apr 22;870:29-44.
 41. Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J, Mumford R. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res*. 2014 Jun 24;186:20-31.
 42. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.
 43. Durmaz EÖ. B hücre aktivasyonu ve antikor üretimi. *Türkderm*, 2013;47; Özel sayı 1;24-47.
 44. Wong RC, Tse HY. Drugs of abuse, Body fluid testing. Chapter 4: The use of nitrocellulose membranes in lateral-flow assays. *Humana press*, 2005, Canada.
 45. Moghadam BY, Connelly KT, Posner JD. Two orders of magnitude improvement in detection limit of lateral flow assays using isotachopheresis. *Anal Chem*. 2015 Jan 20;87(2):1009-1017.
 46. Zhu X, Shah P, Stoff S, Liu H, Li CZ. A paper electrode integrated lateral flow immunosensor for quantitative analysis of oxidative stress induced DNA damage. *Analyst*. 2014 Jun 7;139(11):2850-2857.
 47. Mulder PP, von Holst C, Nivarlet N, van Egmond HP. Intra- and inter-laboratory validation of a dipstick immunoassay for the detection of tropane alkaloids hyoscyamine and scopolamine in animal feed. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2014;31(7):1165-76.
 48. Jawaid W, Campbell K, Melville K, Holmes SJ, Rice J, Elliott CT. Development and Validation of a Novel Lateral Flow Immunoassay (LFIA) for the Rapid Screening of Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) from Shellfish Extracts. *Anal Chem*. 2015 May 19;87(10):5324-32.